

# Studies on the Roles of the Diphosphate Moieties of Substrates in Prenyltransferase Reaction (**プレニルトランスフェラーゼ反応におけ る基質の二リン酸部の役割に関する研究**)

著者	後藤 猛
号	1159
発行年	1990
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/25083">http://hdl.handle.net/10097/25083</a>

氏名・（本籍）	ご とう たけし 後 藤 猛
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理博第 1 1 5 9 号
学位授与年月日	平 成 2 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学専攻
学位論文題目	Studies on the Roles of the Diphosphate Moieties of Substrates in Prenyltransferase Reaction （プレニルトランスフェラーゼ反応における基質の二リン酸 部の役割に関する研究）
論文審査委員	（主査） 教 授 小 倉 協 三      教 授 藤 井 義 明 教 授 平 間 正 博

## 論 文 目 次

Introduction

Chapter I The Significance of the Diphosphate Linkage Involved in the Allylic Substrates for Prenyltransferase. Prenyltransferase Reaction of Diphosphate-Modified Allylic Analogues

Chapter II Role of the Diphosphate Moiety of Substrates for Prenyltransferase. Prenyltransferase Reactions of Diphosphate-Modified Homoallylic Analogues

Chapter III Isopentenyl Diphosphate Isomerase Reactions with Diphosphate-Modified Analogues of Isopentenyl Diphosphate

Summary

References

Appendix

# 論文内容要旨

## 緒 論

生合成経路にはしばしば無機ピロリン酸の脱離をともなった可逆反応が見られるが、脱離した無機ピロリン酸は一般に内在性ピロホスファターゼによってリン酸に加水分解されるので、この可逆反応はピロリン酸脱離の方向へ有利に進行する。従って、可逆反応において脱離したピロリン酸の持つ高エネルギー結合は結果的に生合成反応に使われることになる。この例にみられるように生体内では、化学エネルギーは有効に利用され、反応は合目的かつ合理的に行われる。

プレニルトランスフェラーゼは二価金属イオンを必須としてアリル性二リン酸とホモアリル性二リン酸との縮合による炭素鎖延長反応を触媒する酵素であり、最終生成物のプレニル二リン酸の炭素鎖長と立体化学により約十種類もの酵素が見い出されているが、上記の様な生体内でのエネルギーの経済的利用という観点からは、プレニルトランスフェラーゼ反応は例外的に見える。何故ならば、プレニルトランスフェラーゼ反応は不可逆反応でありながら無機ピロリン酸の脱離を伴い、放出される無機ピロリン酸の高エネルギー結合は生合成反応には寄与していないように思われるからである。しかし、著者は生体内反応の高度な合目的性に照らして、プレニルトランスフェラーゼの基質の二リン酸部は何か重要な意味を持つものと考えた。

今までに数多くの基質ホモログが合成され、プレニルトランスフェラーゼの基質特異性および反応機構の研究に用いられてきた。しかし、この基質特異性についての研究は基質のアルキル部位についてのものがほとんどであり、二リン酸部位についての知見は、基質のモノリン酸アナログが全く反応しないということを除けば皆無である。

本研究は、このプレニルトランスフェラーゼの基質の二リン酸部に関する基質特異性を調べるとともに、二リン酸部が果している役割を探ることを目的として行った。

## 第一章 プレニルトランスフェラーゼのアリル性基質に含まれる二リン酸結合の意義、二リン酸部を

### 修飾したアリル性基質アナログのプレニルトランスフェラーゼ反応

第一節 アリル性基質の二リン酸部をメチレンジホスホン酸、イミドジリン酸およびホスホ硫酸で置き換えたジメチルアリルメチレンジホスホン酸 (DMAPCP)、ゲラニルメチレンジホスホン酸 (GPCP)、ファルネシルメチレンジホスホン酸 (FPCP)、ゲラニルイミドジリン酸 (GPNP)、ファルネシルイミドジリン酸 (FPNP)、ゲラニルホスホ硫酸 (GPS)、ファルネシルホスホ硫酸 (FPS) を合成した (スキーム 1)。

ゲラニル二リン酸 (GPP)、ゲラニルモノリン酸 (GP)、GPCP、GPNP、GPS の非酵素的加水分解速度を測定したところ、一次反応速度定数  $k_1$  の大きさは  $GPP > GPS > GPNP > GP > GPCP$  であった。また、GPP、GPCP、GPNP、GPS は  $Mg$  イオンの存在下で加水分解が促進されるのに対して GP は殆ど影響を受けなかった。

第二節及び第三節 DMAPCP, GPCP, GPNP, GPS は全てファルネシルニリン酸 (FPP) 合成酵素の基質となり、さらに、合成したアナログのうち DMAPCP を除く全てのものはソラネシルニリン酸 (SPP) 合成酵素の基質となることがわかった。このことは、プレニルトランスフェラーゼ反応によって脱離する高エネルギー化合物としての無機ピロリン酸は本酵素反応には必須ではないことを意味している。

ホスホ硫酸アナログ (GPS, FPS) に対する酵素の  $K_m$  値は天然基質に対する  $K_m$  値よりも 2 桁大きい値であったが、その他のアナログに対する酵素の  $K_m$  値は十分小さい値を示した。酵素に十分強い親和性を持つことが明らかとなったアナログの FPP 合成酵素反応および SPP 合成酵素反応の最大反応速度 ( $V_{max}$ ) の大きさは、 $GPP > GPNP > GPCP$ ,  $FPP > FPNP > FPCP$  の順序となり、非酵素的加水分解速度  $k_1$  の順序によく対応していた。このことは、C-O 結合の開裂に伴うアリル性カチオンの生成が FPP 合成酵素反応の律速段階であるとする Poulter らの ionization-condensation-elimination 機構を支持しており、同時に SPP 合成酵素反応も同様の反応機構で進行することを示している。

GPCP, GPNP の FPP 合成酵素反応の至適 pH は無機ピロリン酸、メチレンジホスホン酸、イミドジリン酸の  $pK_a$  の違いを反映して天然の FPP 合成酵素反応の至適 pH7.7 よりもアルカリ側にシフトしていた。また、無機ピロリン酸とメチレンジホスホン酸の Mg イオンに対する親和性の違いを反映して、GPCP の FPP 合成酵素反応速度は GPP の場合よりも、より低い Mg イオン濃度で最大になった。これらのことから、アリル性基質のニリン酸部は Mg イオンと錯体を形成した状態で脱離基となり、この錯体を形成するような構造上の特徴が重要であることが明らかになった。アリル性基質の C-O 結合の開裂は Mg イオンによって促進されるので、アリル性基質がモノリン酸ではなくニリン酸エステルであることは酵素反応にとって有利であると言える。

また、無機ピロリン酸は DMAPP に対して拮抗阻害剤となるが GPP に対して拮抗阻害剤となることが分かった。このことは FPP 合成酵素には二種類のアリル性基質結合部位 (DMAPP 結合部位と GPP 結合部位) が存在することを意味している。さらに極少量のピロリン酸は GPP をプライマーとする FPP 合成酵素反応を活性化するが、DMAPP をプライマーとする反応には殆ど影響を与えないことが分かった。以上の事から、DMAPP と IPP との縮合反応で生成した無機ピロリン酸は DMAPP 結合部位に在って、同時に生成した GPP の C-O 結合の開裂促進に寄与しているものと考えられる。

## 第二章 プレニルトランスフェラーゼの基質のニリン酸部の役割、ニリン酸部を修飾した

### ホモアリル性基質アナログのプレニルトランスフェラーゼ反応

第一節 ホモアリル性基質のニリン酸部を修飾したイソペンテニルメチレンジホスホン酸 (IPCP), イソペンテニルイミドジリン酸 (IPNP), イソペンテニルホスホ硫酸 (IPS) を合成した (スキーム 2)。また、 $[1-^3H]IPCP$  (spec. act., 0.45 Ci/mol) も合成した。これらのホモア

リル性基質アナログの Mg イオン錯体生成定数  $K_i$  を測定したところ、その順序は IPCP > IPP > IPNP > IPS であった。

第二節及び第三節 IPCP, IPNP, IPS はすべて FPP 合成酵素と SPP 合成酵素の基質となることを明らかにし、IPCP の酵素反応においては  $K_m$  と  $V_{max}$  を求めた。IPCP の FPP 合成酵素反応および IPCP, IPNP の SPP 合成酵素反応の至適 pH は酸性側にシフトしていた。また、IPCP の FPP 合成酵素反応速度は、pH6.6 では Mg イオン濃度の増加にともなって双曲線的に増加して最大に達するが、pH8.2 では低い Mg イオン濃度で反応速度は極大に達したのち指数関数的に減少した。先に求めた Mg イオンとの錯体生成定数を用いて各 pH での遊離の IPCP の濃度と Mg-GPP 錯体の濃度を計算すると、Mg イオン濃度の変化による酵素反応速度の変化は、Mg-GPP 錯体の濃度の増加と遊離の IPCP の濃度の減少によく対応していた。このことは、IPCP が金属イオンと結合しない形で FPP 合成酵素の基質となることを意味している。しかし、IPP と GPP の FPP 合成酵素反応の Mg 濃度依存性を調べたところ、遊離の IPP の濃度が低くなるような条件下でも反応速度の減少はみられなかった。よって著者は、IPP-Mg 錯体から一時的に Mg イオンを奪い、遊離の IPP が縮合反応して生成したアリル性二リン酸に再びこの Mg イオンを渡すような酵素反応機構を提唱し、IPCP-Mg 錯体は構造上の違いから Mg イオンの受け渡しが出来ないために遊離の IPCP が基質となるものと考察した。さらに著者は、金属イオンと錯体を形成したアリル性基質の二リン酸部は脱離基となり、ホモアリル性基質の二リン酸部は縮合反応を促進する求核剤として働く、基質の二リン酸部の二様の役割を提唱した（スキーム 3）。

### 第三章 イソペンテニル二リン酸の二リン酸部を修飾した

#### 基質アナログの IPP イソメラーゼ反応

二リン酸部を修飾した基質アナログ、IPCP, IPNP, IPS は全て IPP イソメラーゼの基質となることを明らかにし、IPP イソメラーゼの基質もその構造的特徴が重要であることを示した。IPCP の IPP イソメラーゼ反応の  $V_{max}$  は天然の反応より小さかったが、酵素の IPCP に対する  $K_m$  は小さい値を示した。また、IPP および IPCP の IPP イソメラーゼ反応に対する pH と金属イオン濃度の影響を調べたところ、IPP も IPCP も金属イオンと錯体を形成した状態で基質となることが分かった。

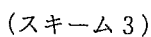
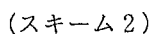
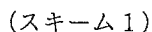
IPCP の IPP イソメラーゼ反応とプレニルトランスフェラーゼ反応とを比較した結果は、金属イオンと結合していない IPCP がプレニルトランスフェラーゼの基質となるという第二章での見解を支持しているものである。

#### まとめ

プレニルトランスフェラーゼおよび IPP イソメラーゼの基質の二リン酸部を修飾したアナログを合成し、高エネルギー化合物としてのアリル性基質の二リン酸部は酵素反応に必須では

なく、その構造的特徴および加溶媒分解速度に及ぼす効果が重要であることを明らかにした。

いろいろな条件下でのアナログの反応性を比較検討し、プレニルトランスフェラーゼ反応に果たす基質の二リン酸部の役割について以下のことを明らかにした。すなわち、ホモアリル性基質の負に荷電した二リン酸部は縮合反応の際の求核剤として働き、この二リン酸部は新しく生成したアリル性基質の二リン酸部として金属イオンを配位して脱離基として働く。すなわち、プレニルトランスフェラーゼ反応においては、基質のピロリン酸結合の高エネルギーではなく、この二様の機能が巧みに利用されているものと考えられる。



## 論文審査の結果の要旨

本論文はプレニルトランスフェラーゼの反応における基質のピロリン酸構造（二リン酸部）の意義を論じたものである。生体内の反応には、無機ピロリン酸の脱離と共役して化学結合が形成される多くの可逆反応があるが、それらの反応においては、脱離したピロリン酸は内在性のピロホスファターゼの作用でリン酸に不可逆的に加水分解されるため、終局的にはピロリン酸に含まれる高エネルギー結合が化学結合形成反応を一方向に進行させることに寄与しており、エネルギーが合目的的に使われているといえる。しかし、プレニルトランスフェラーゼによる炭素・炭素結合形成反応は不可逆反応であるにも拘らず、無機ピロリン酸の脱離と共役している点で生体内反応としては例外的である。著者はこの点に着目して、この酵素の基質の二リン酸部の役割を調べることで、一見エネルギー的には不合理にみえるピロリン酸脱離型の反応の意義を探ろうとした。

まず、アリル型基質の二リン酸部分に修飾を施し、高エネルギー結合を含まない基質類似体を多数合成し、それらの酵素反応を詳しく調べた。その結果、二リン酸部分は、高エネルギー結合として寄与するのではなく、マグネシウムと錯体を形成して優れた遊離基となる点で重要であること、およびその構造のかたちが酵素との親和性に必須であることを明らかにした。次に、ホモアリル型の基質についても二リン酸部分を修飾した基質類似体を合成し、それらの人工基質の反応につき、pH やマグネシウムイオン濃度の影響等を詳しく調べた。その結果、著者はホモアリル型基質の二リン酸部分は3価に負荷電したままで、求核的な効果を発揮することによって、縮合反応を促進することに役立っていることを示し、このように二通りの役割を果しうところに二リン酸構造の意義があると提唱した。これによって、二リン酸部分に関する修飾基質の数多くが見いだされ、プレニルトランスフェラーゼの反応機構の理解を深めることに大きく貢献した。これは著者が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、後藤猛提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。